

TUMORINDUKTION BEI GOLDHAMSTERN
DURCH DIE GLEICHZEITIGE GABE VON
HERPES-SIMPLEX-VIRUS UND METHYLCHOLANTHREN
SOWIE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEREN VERHALTEN
IN VIVO UND IN VITRO

Wolfgang Walter

1973

Aus der Kinderklinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Betke

Tumorinduktion bei Goldhamstern durch die gleichzeitige
Gabe von Herpes - simplex - Virus und Methylcholanthren
sowie Untersuchungen über deren Verhalten in vivo und
in vitro

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Wolfgang Walter

aus

Puch

Jahr

1973

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Otmar Goetz

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Erich Langer

Dekan: Prof. Dr. med. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.1973



Inhalt

Seite

I.	Einleitung	1
II.	Hauptteil	
A.	Grundlagen für unsere Untersuchungen	3
1.	Tumorinduktion durch Methylcholanthren	
2.	Tumorinduktion durch Herpes-simplex-Viren	
3.	Tumorinduktion durch die Kombination von Herpes-simplex-Virus und Methylcholanthren	
B.	Eigene Untersuchungen	
1.	Tumorinduktion bei Goldhamstern durch die gleichzeitige Gabe von Herpes-simplex-Virus und Methylcholanthren	8
a)	Material und Methode	
b)	Ergebnisse	
2.	Kontrolluntersuchung zur Prüfung der Malignität der induzierten Tumoren und Beobachtungen über die Latenz bei Verimpfung von Tumorgewebe	12
a)	Material und Methode	
b)	Ergebnisse	
3.	Verimpfung von Tumorgewebe auf mit Herpes-simplex- Virus vorimmunisierte Goldhamster	14
a)	Material und Methode	
b)	Ergebnisse	
4.	Behandlung von Tumorzellkulturen mit Herpes- simplex-Antiseren	16
a)	Material und Methode	
b)	Ergebnisse	
III.	Diskussion	19
IV.	Zusammenfassung	23
V.	Literatur	24



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554605_0036

I. Einleitung

Die Virusätiologie der malignen Entartung nahm ihren Ursprung in einer Entdeckung von Rous, der 1911 einen durch ein Virus induzierten Tumor bei Hühnern beschrieb (53). Obwohl man in der Folgezeit bei einer Reihe von Viren experimentell eine onkogene Wirkung demonstrieren konnte (13), forderten noch in den fünfziger Jahren Stanley und andere Forscher ein einziges hypothetisches Krebsvirus für die Tumorgenese (2,63).

In den letzten Jahren ist eine besondere Gruppe von DNS - Viren in Verbindung mit der Karzinogenese in den Vordergrund gerückt (13,36).

Sie gehören in die Gruppe der ubiquitär vorkommenden Herpes - Viren (42,68) und sie erlangten besondere Bedeutung, da man eine eindeutige Beziehung zwischen diesen Herpes - Viren und einigen unter natürlichen Bedingungen entstandenen malignen Entartungen aufzeigen konnte (13,36,37).

Bisher ungeklärt bleibt jedoch weiterhin die Frage, auf welche Art und Weise sich die onkogene Wirkung der Herpes - Viren manifestieren kann.

Die Viren könnten direkt als Nukleoproteide den befallenen Gastzellen ihre in den Nukleinsäuren enthaltenen Informationen aufzwingen und so über einen anomalen Stoffwechsel die Entstehung maligner Neubildungen verursachen (15,57,59) oder erst nach Veränderung durch Mutationen in ähnlicher Weise wirksam werden (4,20,21,70). Weiterhin könnte die Reaktion der Wirtszellen auf die akute oder latente Infektion mit Herpes - Virus den Wegbereiter für eine maligne Entartung darstellen (2,30,36). Neuerdings betrachtet man die Tumorgenese durch Viren auch als ein immunologisches Problem (31,45,46).

Da es bisher nicht gelungen ist, Tumoren experimentell allein durch Herpes - Viren zu induzieren (22,64,67), muß man weiterhin eine Kombinationswirkung von Herpes - Viren mit endogenen oder exogenen Faktoren im Sinne einer Bahnung für die maligne Manifestation in die Überlegungen mit einbeziehen (50).

Munk hält die Ansatzpunkte der tumor erzeugenden Wirkung von chemischen Karzinogenen und onkogenen Viren für sehr ähnlich, da beide ihre kanzerogene Wirkung direkt oder indirekt durch eine Störung zellgenetischer Funktionen ausüben (38). Somit wäre eine Synthese der Mutations- und der Virustheorie des Krebses auf molekulargenetischer Basis möglich (70) und damit auch die Potenzierung des malignen Potentials durch die Kombination entsprechend wirksamer Faktoren denkbar (4,2).

In der vorliegenden Arbeit beschäftigen wir uns mit der Möglichkeit einer solchen Kombinationswirkung: der Tumorinduktion bei Goldhamstern durch die gleichzeitige subcutane Injektion von Herpes - simplex - Virus Typ I und dem chemischen Karzinogen Methylcholanthren. Weiterhin untersuchten wir das Verhalten der erzeugten Tumoren in vivo bei Verimpfung auf mit Herpes - simplex - Virus vorimmunisierte Goldhamster, sowie ihr Verhalten in vitro bei Behandlung mit spezifischem Antiserum.

II. Hauptteil

A. Grundlagen für unsere Untersuchungen

1. Tumoringuktion durch Methylcholanthren

Methylcholanthren, ein aromatischer Kohlenwasserstoff, der sich von 1,2 - Benzanthracen ableitet (51), weist interessanterweise eine nahe Verwandtschaft mit der Stoffklasse der Steroide auf (9). Ausgehend von Gallensäuren gelang experimentell über Desoxycholsäure die Darstellung von Methylcholanthren (69). Dannenberg hält eine solche Umwandlung auch im Organismus für möglich (9).

Entsprechend anderer aromatischer Kohlenwasserstoffe entdeckte man die kanzerogene Wirksamkeit von Methylcholanthren. So konnte durch Behandlung mit Methylcholanthren sowohl eine maligne Entartung von Zellkulturen in vitro (3,12), als auch die Induktion von Tumoren an einer Vielzahl von Versuchstieren, wie Mäusen (14), Ratten (61) und sogar den gegenüber aromatischen Kohlenwasserstoffen relativ resistenten Meerschweinchen (29) erfolgreich demonstriert werden.

Ausführliche Beschreibungen experimenteller Untersuchungen mit Golchamstern finden sich bei Nettleship (40). Er injizierte den Tieren Methylcholanthren subcutan. Obwohl er bereits nach 24 Stunden am Injektionsort histologisch Veränderungen an den Fibroblasten nachweisen konnte, entwickelten sich erst nach Latenzzeiten von 60 bis 80 Tagen an diesen Stellen solide Fibrosarkome.

Genauere Kenntnisse über die Wirksamkeit von Methylcholanthren in Bezug auf die verwendeten Dosen und Konzentrationen, sowie die Latenzzeiten und die Häufigkeit von Metastasen verdanken wir den systematischen Experimenten der Gruppe um Riviére (7,48,49).

Es besteht eine direkte Abhängigkeit der injizierten Dosis Methylcholanthren und der Anzahl der erzeugten Tumoren (7,48). Die Zahl der beobachteten Tumoren war aber auch direkt abhängig von der Konzentration der Substanz (7). Die Latenzzeit bis zum Auftreten von sichtbaren Tumoren war umso länger, je geringer die Dosis bzw. die Konzentration von Methylcholanthren gewählt worden war (48). Metastasen wiederum wurden umso häufiger gefunden, je größer die verwendete Dosis des chemischen Karzinogens war (49).

Die Lokalisation der durch aromatische Kohlenwasserstoffe induzierbaren Tumoren hängt neben der Art der Applikation auch vom Alter der Versuchstiere ab (32). So entstehen bei Verwendung von Dimethylbenzanthrazen als kanzerogene Substanz nur wenige Tumoren am Injektionsort. Mit dem Alter der Tiere nimmt die Wahrscheinlichkeit einer lokalen Tumorentstehung zu (66).

2. Tumorinduktion durch Herpes - simplex - Viren

Die Herpes - simplex - Viren gehören in die Gruppe der DNS - Viren (42, 68). Das Herpes - simplex - Virus wurde (35,54) und wird (13,36,62) immer wieder in Beziehung zu Tumoren diskutiert, zumal es auch gelungen ist, Viren der Herpes - Gruppe in verschiedenen Tumoren nachzuweisen.

Aus der Tierpathologie sind die Mareksche Krankheit, eine epidemisch auftretende, generalisierte Lymphomatose der Hühner (8) und der Lucké - Tumor, ein Nierenkarzinom, das bei Fröschen endemisch auftritt (17), bekannt. Erst vor kurzem konnte von einem an Lymphosarkomatose erkrankten Rind ein Herpes - ähnliches Virus isoliert werden (34).

Aus der Humanpathologie kennt man das in Afrika, sowie vereinzelt in Europa und Nordamerika vorkommende Burkitt - Lymphom (6, 26, 27) und das unter der asiatischen Bevölkerung auftretende Nasopharyngealkarzinom (16).

Heute diskutiert man insbesondere das Herpes - simplex - Virus von genitaler Lokalisation (Typ 2) als auslösenden Faktor des Portio - Karzinoms der Frau (1,39,47,56,62).

Unter experimentellen Bedingungen konnte man allerdings bisher eine direkte onkogene Wirksamkeit des Herpes - simplex - Virus nicht beobachten.

So versuchten Girardi und Mitarbeiter bei Goldhamstern vergeblich durch Verimpfung des Virus Tumoren zu erzeugen (22). Auch Trentin und seinen Mitarbeitern gelang es nicht, bei ihren Versuchstieren durch Verimpfung von Herpes - simplex - Virus Tumoren zu induzieren (67). Ebenso zeigte sich bei Tanaka unter diesen Bedingungen kein Erfolg (64).

3. Tumorinduktion durch die Kombination von Herpes - simplex - Virus und Methylcholanthren

Über die Tumorinduktion durch die gemeinsame Gabe von Herpes - simplex - Virus und Methylcholanthren finden sich in der Literatur nur wenige Beispiele.

Tanaka und Mitarbeiter berichten über entsprechende Untersuchungen mit Mäusen (64).

Nachdem sie ihren Versuchstieren Herpes - simplex - Virus intradermal injiziert hatten, brachten sie über einen Zeitraum von 5 Tagen täglich einmal auf die betreffenden Hautstellen Methylcholanthren lokal auf. Dabei konnten sie beobachten, daß an den mit Herpes - simplex - Virus vorbehandelten Hautregionen früher und häufiger Papillome auftraten, als an den allein mit Methylcholanthren behandelten.

Wurden die intradermalen Injektionen mit Herpes - simplex - Virus aber 7 Tage vor, beziehungsweise 14 Tage nach der Applikation von Methylcholanthren vorgenommen, so entsprachen die Ergebnisse denen der Kontrollgruppen.

Ähnliche Experimente beschreiben Southam und Mitarbeiter (60). Auch sie injizierten das Herpes - simplex - Virus intradermal und tropften anschließend Methylcholanthren auf die entsprechenden Hautbezirke.

8 Wochen nach Versuchsbeginn fanden sie bei 26 % der Tiere Hautpapillome, während an Stellen, die nur mit Methylcholanthren behandelt worden waren bei 16 % ihrer Versuchstiere lokal entstandene Papillome beobachten konnten. Ebenso ergaben sich bei ihnen keine Unterschiede gegenüber einer Kontrollgruppe, wenn sie das Herpes - simplex - Virus erst eine Woche nach Aufbringung des Methylcholanthren injizierten.

Entsprechende Befunde erhielten sie, wenn das Herpes - simplex - Virus gemeinsam mit einem spezifischen Antiserum verimpft worden war.

Interessant sind ihre weiteren Beobachtungen über die maligne Entartung der induzierten Papillome. Sie fanden, gegenüber der allein durch Methylcholanthren induzierten Hautpapillome, eine dreimal so hohe Karzinomrate bei den durch die kombinierte Behandlung mit Herpes - simplex - Virus und Methylcholanthren erzeugten Papillome.

B. Eigene Untersuchungen

1. Tumorinduktion bei Goldhamstern durch die gleichzeitige Gabe von Herpes - simplex - Virus und Methylcholanthren

a) Material und Methode

Virus: Herpes - simplex - Virus Typ 1⁺
 Titer: 10^3 /ml und 10^8 /ml, jeweils 0,5 ml als einmalige Injektion
 Kanzerogen: Methylcholanthren der Firma Schuchardt GmbH in kristalliner Form, jeweils 0,05 mg als einmalige Injektion.
 Als geeignetes Lösungsmittel für Methylcholanthren verwendeten wir Olivenöl, das zur vollständigen Lösung in einem Wasserbad auf 37° Celsius erwärmt wurde (65). Es wurde eine Konzentration von 10 mg% hergestellt, was 0,05 mg wirksamer Substanz pro 0,5 ml Olivenöl entsprach.
 Versuchstiere: Goldhamster, 6 Wochen alt

Versuchsordnung:

- 1) Zwei Gruppen von je 35 Versuchstieren wurden 0,5 ml einer Herpes - simplex - Virussuspension mit einem Titer von 10^3 /ml (Gruppe I) bzw. 10^8 /ml (Gruppe II) gleichzeitig mit 0,05 mg Methylcholanthren in 0,5 ml Olivenöl subcutan injiziert.
- 2) Einer Gruppe von 11 Kontrolltieren wurde nur 0,05 mg Methylcholanthren in 0,5 ml Olivenöl subcutan injiziert.

⁺Wir danken Frau Dr. med. Wahren vom Nat.Bakt.Lab. Stockholm die uns das Virus freundlicherweise zur Verfügung stellte

Alle Injektionen erfolgten nach sorgfältiger Desinfektion subcutan im Bereich der linken Schulterblattgegend, nach einer flüchtigen Äthernarkose der Hamster. Es war ein weites Vorschieben der Kanüle notwendig, um ein Zurücklaufen der Substanzen zu verhindern.

Bei den Tieren der beiden Versuchsgruppen wurde zuerst Methylcholanthren injiziert und dann durch die noch liegende Kanüle die Herpes - simplex - Virussuspension nachgespritzt. Die sichere subcutane Lage der Kanülen wurde durch Anheben der Injektionsnadelspitze kontrolliert.

Die Tiere wurden isoliert in Käfigen gehalten, um mögliche Veränderungen der Versuchsbedingungen, zum Beispiel durch Bißwunden, auszuschließen. Als Nahrung erhielten die Tiere Trockenfutter und Wasser. Sie wurden zu Beginn der Untersuchungen einmal, später zweimal wöchentlich auf die Entstehung von Tumoren hin untersucht.

War ein Tumor am Ort der Injektion auf eine durchschnittliche Größe von 2 x 2 cm herangewachsen, so wurde das Tier in Äthernarkose getötet und der Tumor unter aseptischen Bedingungen entnommen. Anschließend wurden die Tiere sezziert und es wurde nach makroskopisch sichtbaren Metastasen gesucht.

Ein Teil eines entnommenen Tumors wurde jeweils für weitere Versuche verwendet, während das Reststück in 10 %iger Formollösung fixiert wurde. Später wurde es in Methacrylat (5), modifiziert nach Boellard und Hirsch, eingebettet, und nach HE-Färbung (52) zur pathologisch-histologischen Diagnose verwendet.

b) Ergebnisse

Innerhalb einer Beobachtungsdauer von 460 Tagen (Gruppe I) bzw. 400 Tagen (Gruppe II) ergaben sich die in Tabelle 1 zusammengestellten Ergebnisse.

Während die Tumorräte bei den Kontrolltieren 0 % betrug, fanden sich in der Gruppe I bei 26 % der Goldhamster Tumoren am Injektionsort. Bei den Versuchstieren der Gruppe II zeigte sich innerhalb der kürzeren Beobachtungszeit noch eine Tumorräte von 14 %.

Alle beobachteten Tumoren wuchsen nach den jeweils angegebenen Latenzzeiten innerhalb weniger Tage bis zu der von uns geforderten Größe von ca. 2 x 2 cm heran. Sie lagen im subcutanen Bindegewebe, waren von derber Konsistenz und ließen sich gut in toto herauspräparieren, da sie keinerlei Infiltrationen in die umgebende Muskulatur zeigten.

Die Schnittflächen waren von weiß-gelblicher Farbe und hin und wieder von kleinen Blutgefäßen durchzogen. Gelegentlich fanden sich bereits zentrale nekrotische Einschmelzungsherde. Metastasen konnten trotz sorgfältiger Sektion der Tiere in keinem Fall gefunden werden. Die histologisch-pathologische Diagnose lautet pleomorphes Sarkom.⁺

Im Vergleich der beiden Versuchsgruppen fiel auf, daß die mit einer Herpes - simplex - Viruslösung mit einem Titer von 10^8 /ml (Gruppe II) behandelten Tiere gegenüber der Gruppe, der eine Herpes - simplex - Virussuspension mit einem Titer von 10^3 /ml (Gruppe I) injiziert worden war, eine um ca. 100 Tage längere Latenzzeit bis zum Auftreten der ersten Tumoren hatten. Die beiden Kurvenverläufe entsprechen sich im übrigen Verlauf (Abb. 1).

⁺Wir danken Herrn Univ. Doz. Dr. med. P. Meister vom Pathologischen Institut der Universität München für die Beurteilung der histologischen Präparate

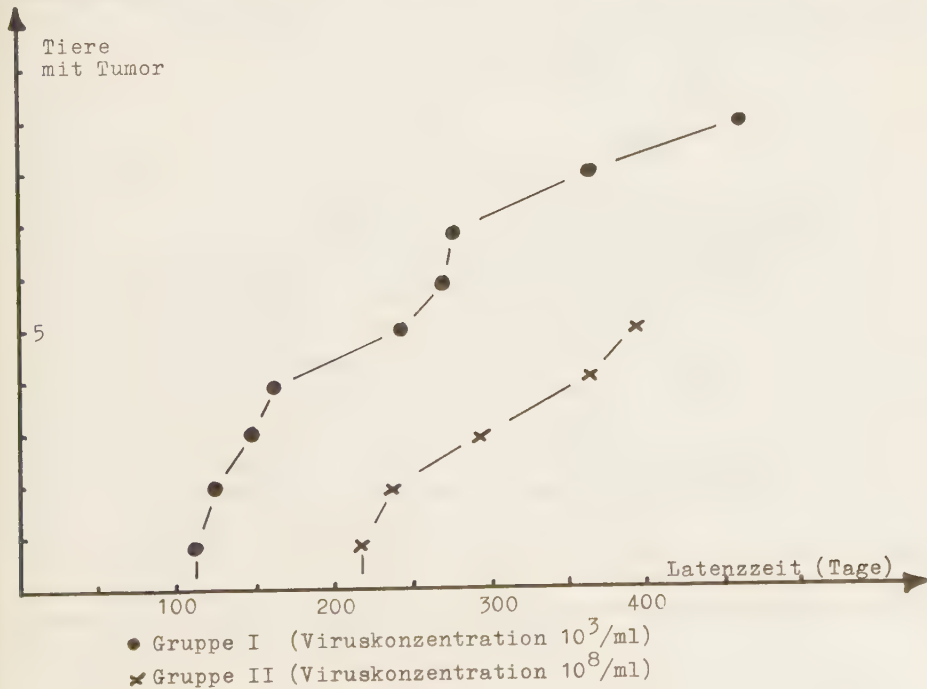
Tabelle 1: Tumorinduktion bei Goldhamstern durch die gleichzeitige Gabe von Herpes - simplex - Virus und Methylcholanthren

	Zahl der Tiere	MC (mg)	Virus- konzentration	Beob- achtungs- dauer (Tage)	Zahl der Tumoren	Latenzzeit (Tage)	Tumor- rate
Gruppe I	35	0,05	10^3 /ml	460	9	107, 118, 146, 157, 237, 262, 265, 373, 450	26% ⁺
Gruppe II	35	0,05	10^8 /ml	400	5	202, 236, 298, 361, 378	14%
Kontrolle	11	0,05	-	460	0	-	0%

MC = Methylcholanthren

⁺ Ein Tier starb während des Versuchs

Abbildung 1: Latenzzeit bis zum Auftreten der induzierten Tumoren



2. Kontrolluntersuchung zur Prüfung der Malignität der induzierten Tumoren und Beobachtungen über die Latenz bei Verimpfung von Tumorgewebe

a) Material und Methode

Tumorgewebe: die Tumorzellen stammten von Hamstern, die Herpes - simplex - Virus und Methylcholanthren injiziert bekamen (siehe Versuch 1)

Versuchstiere: Goldhamster, 6 Wochen alt

Versuchsanordnung:

Zur Kontrolle der Malignität der induzierten Tumoren führten wir Tumorpässagen durch (4, 31). Dazu wurden die unter aseptischen Bedingungen entnommenen Tumorgewebestücke mit Hilfe von sterilen Scheren und Messern so fein zerteilt, daß sie mit einer Tuberkulinspritze aufgenommen werden konnten.

Von der auf diese Weise verarbeiteten Tumormasse wurde insgesamt 24 Goldhamstern jeweils 0,2 ml subcutan injiziert. Die Tiere wurden jeden zweiten Tag auf das Vorhandensein von sichtbaren Tumoren hin untersucht.

b) Ergebnisse

Nach einem Beobachtungszeitraum von 150 Tagen zeigten sich die in Tabelle 2 zusammengestellten Ergebnisse.

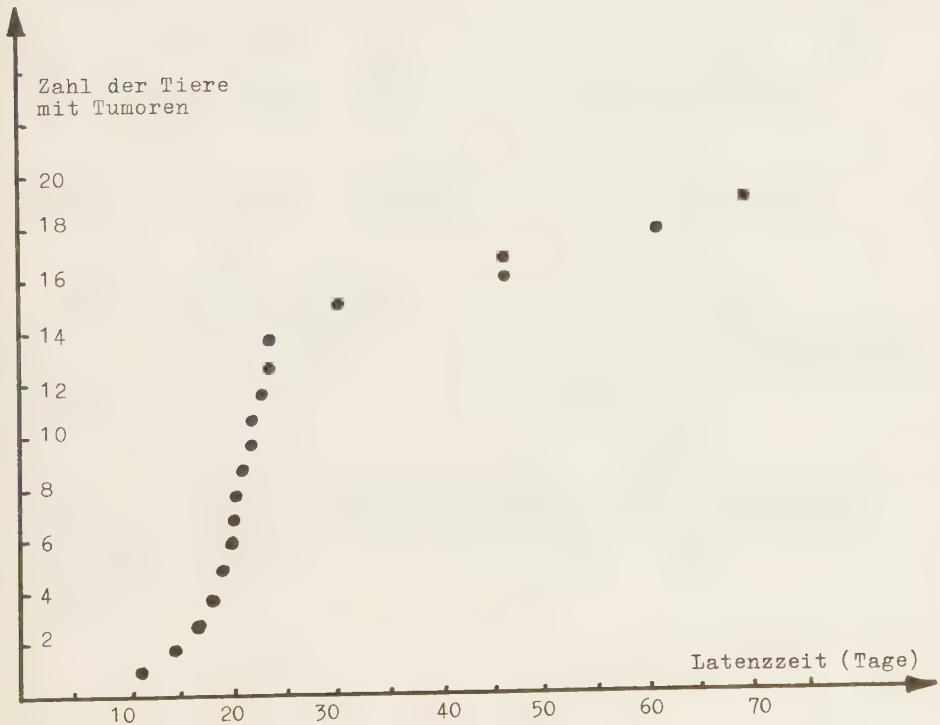
Die positive Verimpfungsrate für das Tumorgewebe betrug 79 %. Die durchschnittliche Latenzzeit bis zum Auftreten von sichtbaren Tumoren war 28 Tage, wobei jedoch 74 % der beobachteten Tumoren innerhalb von 24 Tagen nach Verimpfung auftraten (Abb. 2). Die maximale Latenz bis zum Auftreten eines Tumors betrug 69 Tage.

Die Tumoren erreichten Pflaumengröße. Eine Abstoßungsreaktion konnte in keinem Fall beobachtet werden. Histologisch erwiesen sich die Tumoren entsprechend den Primärtumoren als pleomorphe Sarkome.

Tabelle 2: Kontrolle der Malignität der induzierten Tumoren durch Verimpfung auf Goldhamster

Zahl der Tiere	Tumor-gewebe (ml)	Beob-achtungsdauer (Tage)	Zahl der Tumoren	Latenzzeit (Tage)	Tumor-rate	durchschnittliche Latenz (Tage)
24	0,2	150	19	11,14,17,18,19,20,20,20,21,22,22,23,24,24,30,47,47,62,69	79%	28

Abbildung 2: Latenzzeit bis zum Auftreten von sichtbaren Tumoren bei Verimpfung von 0,2 ml Tumorgewebe auf Goldhamster



3. Verimpfung von Tumorgewebe auf mit Herpes - simplex - Virus vorimmunisierte Goldhamster

a) Material und Methode

Virus: Herpes - simplex - Virus Typ 1
 Titer: 10^8 /ml

Tumorgewebe: die Tumorzellen stammten von Hamstern, die Herpes - simplex - Virus und Methylcholanthren injiziert bekamen (siehe Versuch 1)

Versuchstiere: Goldhamster, 6 Wochen alt

Versuchsanordnung:

Zur Vorimmunisierung der Goldhamster verwendeten wir folgendes Impfschema:

Über einen Zeitraum von 3 Wochen wurde den 4 Goldhamstern zweimal wöchentlich jeweils 0,5 ml einer Herpes - simplex - Viruslösung mit einem Titer von 10^8 /ml intraperitoneal injiziert.

4 bis 12 Wochen nach erfolgter Impfung wurden jeweils einem vorimmunisierten Goldhamster und einem Kontrolltier 0,2 ml Tumorgewebe desselben Tumors subcutan übertragen.

Nach dem Auftreten von sichtbaren Tumoren bzw. nach Beendigung des Versuches, wurde den 4 vorimmunisierten Goldhamstern mittels einer Herzpunktion ca. 5 ml Blut entnommen. In den durch Zentrifugieren gewonnenen Seren versuchten wir durch einen Neutralisationstest (24) Antikörper des Herpes - simplex - Virus und damit den Impferrfolg nachzuweisen.

b) Ergebnisse

Nach einer Beobachtungszeit von 80 Tagen fanden wir die in Tabelle 3 zusammengefaßten Ergebnisse.

Tabelle 3: Verimpfung von 0,2 ml Tumorgewebe auf mit Herpes - simplex - Virus vorimmunisierte Goldhamster

	Kontrolltiere		Versuchstiere	
	Tumor	Latenz (Tage)	Tumor	Latenz (Tage)
Versuch I	+	16	-	80
Versuch II	+	22	-	80
Versuch III	+	25	+	18
Versuch IV	+	43	+	44

+ = Tumor am Injektionsort - = kein Tumor nachweisbar

Bei allen Kontrolltieren und bei 2 von 4 Versuchstieren traten Tumoren auf. Der makroskopische und histologische Befund des Tumorgewebes der mit Herpes - simplex - Virus vorimmunisierten Goldhamster entsprach dabei dem der Kontrolltiere. Die histologisch-pathologische Diagnose war pleomorphes Sarkom.

Die Latenzzeit bis zum Auftreten von Tumoren hängt von der Menge des injizierten Tumorgewebes ab (43,44). In einem Vorversuch (siehe Abb. 2) hatten wir die maximale Latenzzeit für das Auftreten von sichtbaren Tumoren bei Verimpfung von 0,2 ml Tumorgewebe mit 69 Tagen ermittelt.

Bei 2 von 4 Versuchstieren trat nach einer Beobachtungszeit von 80 Tagen kein Tumor auf. Auch bei sorgfältiger Sektion konnte kein morphologischer Anhalt für das Angehen der verimpften Tumorzellen gefunden werden.

Bei allen 4 mit Herpes - simplex - Virus vorimmunisierten Goldhamstern ließen sich mit einem Neutralisationstest spezifische Antikörper nachweisen. Damit konnte der Impferfolg nachträglich bestätigt werden.

4. Behandlung von Tumorzellkulturen mit Herpes - simplex - Antiseren

a) Material und Methode

Antiseren: 1) Herpes - simplex - Antiserum vom Meerschweinchen
Microbiological Associates Bethesda

2) Polio I Antiserum vom Kaninchen
Italdiagnostik

Medium: Eagle' Basal Medium (BME)
FA Grand Island Biological Company (11)
Zusätze (23): Bikarbonat, Streptomycin,
Penicillin, Phenolrot
Kälberserum 10% als Nährmedium, 2% als Erhaltungsmedium

Trypsin: Difco 1:250 (als 0,25 %ige Lösung)

Farbstoff: 0,1 %ige Lösung von Trypanblau in PPL (23)

Tumorgewebe: die Tumorzellen stammten von Hamstern, die Herpes - simplex - Virus und Methylcholanthren injiziert bekamen (siehe Versuch 1)

Versuchstiere: Goldhamster, 6 Wochen alt

Versuchsanordnung:

Das unter aseptischen Bedingungen entnommene Tumorgewebestück wurde sofort für die Gewebekultur weiterverarbeitet. Zur Anlage der Zellkulturen fanden nur Gewebeteile aus nicht nekrotischen Bereichen Verwendung.

Sie wurden mit sterilen Scheren und Messern zerkleinert. Anschließend wurden sie mehrmals mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und durch leichtes Abzentrifugieren die anhaftenden Blutbestandteile entfernt. Die Tumorzellmasse wurde dann mit ein paar Tropfen BME versetzt und anschließend weiter zerkleinert.

Dann wurde mit einer kleinen Pipette 1 ml dieser Tumorzellsuspension abpipetiert und in eine Vierkantflasche gegeben,

die mit Nährmedium auf 15 ml aufgefüllt wurde.

Die Flaschen wurden bei 37° Celsius in einem Brutschrank aufbewahrt. Nach Umschlag der zugesetzten Indikatorlösung wurden die Tumorzellkulturen mit Erhaltungsmedium gefüttert.

Sobald sich bei der mikroskopischen Kontrolle, gewöhnlich nach 3 bis 5 Tagen, zeigte, daß der Boden einer Flasche mit einem dichten Zellrasen besiedelt war, legten wir durch Trypsinieren Subpassagen an.

Für die Behandlung der Tumorzellkulturen mit spezifischen Antiseren wurde sowohl vom Herpes - simplex - Antiserum des Meerschweinchens als auch vom Polio I Antiserum des Kaninchens mit Hilfe von BME eine Verdünnung von 1:16 hergestellt. Dann wurden Tumorzellkulturen durch 0,25 %ige Trypsinlösung abgelöst, mehrmals mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und 10 Minuten bei 1:1000 U/Min zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurde dem Bodensatz aus Tumorzellen 3 ml BME hinzugegeben.

Von dieser Zellsuspension wurde jeweils 1 ml zusammen mit 1 ml Herpes - simplex Antiserum oder 1 ml Polio I Antiserum oder 1 ml Nährmedium in drei kleine Vierkantflaschen einpipitiert. Die Flaschen wurden 30 Minuten bei 37° Celsius im Brutschrank inkubiert. Dann wurde jeweils 2 ml Nährmedium hinzugegeben und die Flaschen erneut bei 37° bebrütet.

Täglich wurde unter dem Mikroskop kontrolliert, ob sich eine Reaktion der Zellen im Sinne einer Cytolyse zeigte. Später wurde den Flaschen zur eindeutigen Beurteilung einer Zellyse eine 0,1 %ige Lösung von Trypanblau in Plasmaproteinlösung hinzugegeben, die in einer Zellkultur die toten Zellen selektiv blau anfärbt (23).

Zur Kontrolle der Malignität der verwendeten Tumorzellen führten wir einen isologen Transplantationsversuch durch (18). Dazu injizierten wir einem Goldhamster jeweils 0,1 ml der verwendeten Zellsuspensionen nach erneutem Waschen in physiologischer Kochsalzlösung subcutan.

b) Ergebnisse

Die Tumorzellen bildeten innerhalb weniger Tage dichte Zellrasen aus. Sie konnten über viele Subpassagen hinweg am Leben erhalten werden.

Insgesamt neunmal versuchten wir die angelegten Tumorzellkulturen durch Behandlung mit Herpes - simplex Antisera in ihrem Wachstum zu beeinflussen.

Unter dem Mikroskop konnten wir in keinem Fall eine Unterdrückung des Tumorzellwachstums im Sinne einer Zytolyse beobachten. Auch eine Anfärbung der behandelten Zellkulturen mit Trypanblau zeigte keinen verwertbaren Unterschied gegenüber den Kontrollkulturen.

Bei Verimpfung von 0,1 ml der jeweiligen Zellen auf Goldhamster konnte in allen Fällen das Wachstum eines Tumors am Injektionsort beobachtet werden. Der histologisch-pathologische Befund war ein pleomorphes Sarkom.

III. Diskussion

Während man die Bedeutung eines gemeinsamen Effektes von onkogenen Viren und chemischen Karzinogenen bei der Entstehung von Tumoren schon lange kennt (55), finden sich bisher nur wenige Untersuchungen, die sich mit der gleichzeitigen Wirkung eines nicht onkogenen Virus und eines chemischen Karzinogens beschäftigen.

Wir verwendeten in unseren Experimenten als nicht onkogenes Virus im Gegensatz zu Duran-Reynals, von dem 1957 erstmals Versuche dieser Art beschrieben wurden (10), nicht das Vacciniavirus, sondern entsprechend den Angaben von Tanaka (64) und Southam (60) das Herpes - simplex - Virus, da die Gruppe der Herpes - Viren im Rahmen der Tumoriologie in zunehmendem Maße an Bedeutung gewinnt (1,13,36,39,62).

Ebenso wie die erwähnten Autoren benutzten wir Methylcholanthren als kanzerogene Substanz. Wir wählten aber für das chemische Karzinogen eine Dosierung und Konzentration, die in Bezug auf die Induktion von Tumoren in einem unteren Grenzbereich lag (48).

Im Gegensatz zu Tanaka (64) und Southam (60), die in ihren Versuchen mit Mäusen arbeiteten, verwendeten wir als Versuchstiere Goldhamster, da bei ihnen sowohl die onkogene Wirksamkeit eines Virus, als auch die Erzeugung von Tumoren durch karzinogene Substanzen gut demonstriert werden kann (25,40,48). Bei Hamstern entwickeln sich relativ häufig spontane Tumoren. Ihre Anzahl nimmt mit dem Alter der Tiere zu (19). Trentin gibt die Häufigkeit mit 4,4 % an (67), dabei finden sich in der Mehrzahl Lymphome und Melanome, sowie Adenokarzinome des Gastrointestinaltraktes. Der Anteil spontan entstehender subcutan gelegener Tumoren ist praktisch gleich null (28,67). Da die maximale Überlebensdauer für Goldhamster unter Laboratoriumsbedingungen nur ca. 24 Monate beträgt (28), behandelten wir die Tiere im Alter von sechs Wochen, um einen möglichst langen Beobachtungszeit-

raum zur Verfügung zu haben.

Die von uns gewonnenen Ergebnisse einer erhöhten Tumorrates durch die kombinierte Wirkung eines nicht onkogenen Virus und eines chemischen Karzinogens gegenüber der durch die alleinige Wirkung des chemischen Karzinogens erzeugten, stimmen mit den Befunden von Tanaka (64) und Southam (60) überein.

Ein direkter Vergleich mit diesen beiden Arbeiten ist nicht möglich, da sowohl Tanaka, als auch Southam das Herpes - simplex - Virus intradermal injizierten und dann das chemische Karzinogen auf diesen Hautbezirk lokal auftrugen, während wir in unseren Versuchen das Herpes - simplex - Virus und das Methylcholanthren gleichzeitig in einer einmaligen Gabe subcutan injizierten.

Von Roe wird die vermehrte Tumorentstehung bei der intradermalen Injektion von Herpes - simplex - Viren und die gleichzeitige lokale Applikation von Methylcholanthren auf die Haut von Versuchstieren damit erklärt, daß die Behandlung mit Methylcholanthren die durch das Virus hervorgerufene Entzündung beträchtlich verstärkt, so daß ulcerative Veränderungen entstehen, die dann sekundär die Entwicklung von Hauttumoren, welche durch die kanzerogene Substanz hervorgerufen werden, fördern (50).

Diese Erklärung für die erhöhte Tumorrates durch die Kombination von Herpes - simplex - Virus und Methylcholanthren trifft für unsere Versuchsanordnung sicher nicht zu, da sich bei der subcutanen Injektion von Herpes - simplex - Virus keine entzündlichen Läsionen nachweisen ließen (33). Außerdem verwendeten wir Methylcholanthren in einer Dosierung, die unter unseren Versuchsbedingungen für eine Erzeugung von Tumoren nicht ausreichend war.

Unsere Ergebnisse über eine erhöhte Tumorrates durch die Kombinationswirkung von ubiquitär vorhandenen Viren und einem anderen Agens, lassen sich gut in den Rahmen der Tatsachen und Theorien einordnen, die die Karzinogenese als einen komplexen Vorgang verstehen (2,4,58).

Weiterhin konnten wir durch unsere Versuchsanordnung die Bedeutung einer genügend langen Beobachtungszeit herausarbeiten. So entwickelte sich bei einem Versuchstier nach einer Latenzzeit von 450 Tagen noch ein Tumor. Insgesamt traten über 70 % der von uns induzierten Tumoren erst in einem, für Goldhamster unter Laboratoriumsbedingungen, höheren Lebensalter auf (28). Diese Befunde lassen den Schluß zu, daß man auch bei der Gruppe von Goldhamstern, denen Herpes - simplex - Virus mit einem Titer von $10^8/\text{ml}$ (Gruppe II) injiziert worden war, eine höhere Tumorrates als 14 % hätte erwartet werden können, wenn der Beobachtungszeitraum ebenfalls über 400 Tage hinaus ausgedehnt worden wäre.

Aus zahlreichen Tierexperimenten geht hervor, daß es zumindestens beim Tier das Prinzip einer immunologischen Tumoralabwehr gibt (31,38,41,46). Grundmechanismus dieser Tumoralabwehr ist die durch ein sogenanntes Tumoralantigen ausgelöste spezifische immunologische Reaktion. Wenn nun ein Virus direkt onkogen wirksam ist, so besitzt das induzierte Tumorgewebe ein virusspezifisches Antigen, welches sich in vivo mittels spezifischer Antikörper und in vitro mittels eines spezifischen Antiserums indirekt durch Hemmung des Wachstums von Tumorgewebe nachweisen läßt (31,41,46). Da bekannt ist, daß das Herpes - simplex - Virus Typ I nicht direkt onkogen wirksam ist (22, 64,67), versuchten wir im Sinne der oben dargestellten Überlegungen herauszufinden, ob das Herpes - simplex - Virus bei den von uns in Kombination mit Methylcholanthren induzierten Tumoren zur onkogen wirksamen Komponente geworden war (31,41,46).

Während es uns nicht gelang, das Wachstum von Tumorzellkulturen durch Behandlung mit Herpes simplex spezifischen Antiseren zu beeinflussen, konnten wir unter in vivo Bedingungen bei zwei von vier Versuchstieren das Angehen von Tumorzellen nach Verimpfung auf mit Herpes - simplex - Virus vorimmunisierte Goldhamster verhindern.

Es sind weitere Untersuchungen erforderlich, um in den durch Herpes - simplex - Virus und Methylcholanthren induzierbaren Tumoren die onkogen wirksame Komponente zu ermitteln und somit vielleicht in der Kenntnis über die komplexen Wirkungen der Karzinogenese einen Schritt weiterzukommen.

IV. Zusammenfassung

Goldhamster wurde im Alter von 6 Wochen in einer einmaligen Gabe gleichzeitig Herpes - simplex - Virus Typ 1 und Methylcholanthren subcutan injiziert. Das Herpes - simplex - Virus wurde zwei Gruppen mit unterschiedlichen Titern gegeben. Die Dosierung für Methylcholanthren lag in einem für die kanzerogene Wirksamkeit unter-schwelligem Bereich.

Innerthalb einer Beobachtungszeit von 460 Tagen wurde bei beiden Gruppen gegenüber der Kontrollgruppe eine eindeutig erhöhte Tumorrare gefunden. Dabei zeigte die Gruppe von Goldhamstern, die mit einer stärkeren Viruskonzentration behandelt worden war, eine deutlich längere Latenzzeit bis zum Auftreten der ersten Tumoren. Weiterhin konnte die Bedeutung einer genügend langen Beobachtungszeit herausgearbeitet werden, da der größte Teil der induzierten Tumoren sich erst in einem höheren Alter der Tiere entwickelte.

Histologisch erwiesen sich die Tumoren als pleomorphe Sarkome. Ihre Malignität wurde in isolierten Transplantationsversuchen nachgewiesen.

In weiteren Untersuchungen wurde versucht, das Wachstum von Tumorgewebe durch Verimpfung auf mit Herpes - simplex - Virus vorimmunisierte Goldhamster und das Wachstum von Tumorzellkulturen mittels Zugabe von spezifischen Herpes - simplex Antisera zu beeinflussen.

Während unter in vivo Bedingungen bei 2 von 4 Tieren das Angehen der Tumorzellen unterdrückt werden konnte, zeigte sich unter in vitro Bedingungen keine Reaktion.

V. Literatur

- (1) AURELIAN L., J. Royston, H.J. Davis
Antibody to genital herpes-simplex - virus. Association with cervical atypia and carcinoma in situ
J. Nat. Canc. Inst. 45, 455 - 463 (1970)
- (2) BAUER K.H.
Das Krebsproblem
Springer Verlag, 318 - 327 (1963)
- (3) BERWALD Y., L. Sachs
In vitro transformation of normal cells by carcinogenic hydrocarbons
J. Nat. Canc. Inst. 35, 641 - 661 (1965)
- (4) BOCK H.E., R. Gross
Pathophysiologie Band II
Thieme Verlag, 378 - 410 (1972)
- (5) BURCH H.C.
Histologische Technik
Thieme Verlag 1966, 60 - 61
- (6) BURKITT L., G.T. O'Connor
Malignant lymphoma in African children - clinical syndrome
Cancer 14, 258 (1961)
- (7) CHOUROULINKOV I., M.R. Rivière, M. Guérin
Action carcinogène et influence métastatique du méthyl-cholanthrène chez la souris à des doses et concentrations diverses
Bull. Assoc. franç. et Canc. 48, 377 - 84 (1961)
- (8) CHURCHILL A.E.
Herpes type virus isolated in cell culture from tumors of chicken with Marek's disease. I. Studies in cell culture
J. Nat. Canc. Inst. 41, 939 - 950 (1968)
- (9) DANNENBERG H.
Stoffwechsel und endogene Krebsentstehung
Krebsforsch. Krebsbek. 2, 36 (1957)
- (10) DURAN-REYNALS F.
Preliminary studies on the development of neoplasia in the skin of mice painted with methylcholanthrène and injected with cortisone and vaccinia-virus
Ann. N. Y. Acad. Sci. 68, 430 - 40 (1957)

- (11) EAGLE H.
PSEPM 89, 362 (1955)
- (12) EARLE W.R.
Production of malignancy in vitro
J. Nat. Canc. Inst. 10, 1067 - 80 (1950)
- (13) EPSTEIN I.A.
The possible role of viruses in human cancer
The Lancet, June 26, 1344 - 1347 (1971)
- (14) ESMARCK O.
Acta path. microbiol. scand. 19, 79 - 100 (1942)
- (15) FAIKH D., W. Peterknecht
DNS-, RNS- und Proteinsynthese und die Beziehungen
zur Riesenzellbildung in vitro nach Infektion mit
Herpes - virus hominis
Arch. für ges. Virusforschung 24, 267 - 287 (1968)
- (16) FEORINO P., E.L. Palmer, M.L. Martin
Incidence of herpes - virus antibody among leukemic
and nasopharyngeal carcinoma patients
Proc. of the Soc. for Exp. Biol. and Med.
159, 913 - 15 (1972)
- (17) FINK M.A., G.S. King, M. Mizell
Preliminary note: identity of a herpes virus antigen
from Burkitt lymphoma of man and the Lucké adeno-
carcinoma of frogs
J. Nat. Canc. Inst. 41, 1477 - 78 (1968)
- (18) FOLEY G.E., A.H. Handler
Differentiation of "normal" and neoplastic cells
maintained in tissue culture by implantation into
normal hamsters
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 94, 661 - 64 (1957)
- (19) FORTNER J.G.
Spontaneous tumors, including gastrointestinal
neoplasms in the Syrian hamster
Cancer 10, 1153 - 56 (1957)
- (20) GERMANOV A.B., M.J. Sokolov
Selection and Genetic Studies on Mutants of Herpes
Simplex Virus Sensitive to Sulfated Agar Poly-
saccharides
Arch. für ges. Virusforschung 28, 77 - 84 (1969)
- (21) GERMANOV A.B., M. J. Sokolov
Selection of Herpes Virus Mutants Producing Mottled
Plaques in Human Fibroblast Monolayers
Arch. für ges. Virusforschung 28, 85 - 88 (1969)

- (22) GIRARDI A.J., V.M. Larson, M.R.Hillemann
Further tests in hamster for oncogenic quality of
ordinary viruses and mycoplasma with correlative
review
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 118, 173 - 179 (1965)
- (23) GRIST N.R., C.A.C. Koss, E.J. Bell, E.J. Stott
Diagnostische Methoden in der klinischen Virologie
Thieme Verlag, 26 - 42 (1969)
- (24) GRIST N.R., C.A.C. Ross, E.J. Bell, E.J. Stott
Diagnostische Methoden in der klinischen Virologie
Thieme Verlag 42 - 55 (1969)
- (25) GYE W.E., F. Foulds
A note on the production of sarcomata in hamsters
by 3,4 - benzopyrene
Amer. J. Canc. 35, 108 (1939)
- (26) HARRIS R.C.S.
Viruses and human tumors
Arch. f. Geschw. 30, 336 - 340 (1967)
- (27) HENLE G., W. Henle, P. Clifford, V. Diehl, G.W. Kafuko,
B.G. Kirya, G. Klein, R.H. Morrow, G.M.R. Manube,
P. Pike, P.M. Tukei, J.L. Ziegler
Antibodies to epstein - barr - virus in Burkitt's
lymphoma and control groups
J. Nat. Canc. Inst. 43, 1147 - 57 (1969)
- (28) HORN K.H., J. Madry, R. Siewert
Statistische Untersuchungen über die Lebenserwartung
der im Institut für Krebsforschung Berlin - Buch ge-
züchteten Mäuse, Ratten und Goldhamster und deren
Spontantumorquoten unter bestimmten Standardbestimmungen
Arch. f. Geschwulstforschung 29, 231 - 251 (1967)
- (29) HORNING, L. Dmochowski
Brit. J. Cancer 1, 59 (1947)
- (30) HUMPHREY J.H., R.G. White
Kurzes Lehrbuch der Immunologie
Thieme Verlag, 275 - 276 (1971)
- (31) HUMPHREY J.H., R.G. White
Kurzes Lehrbuch der Immunologie
Thieme Verlag, 386 - 397 (1971)
- (32) IRINO S.
Organ distribution of 3 MC after repeated painting
and oral administration in relation to the induction
of leukemia in mice
Gann 59, 223 - 29 (1968)

- (33) KAPLAN A.S.
Herpes simplex and pseudorabies viruses
Virology Monographs 5, 115 (1969)
- (34) MAATEN v.d.M.J., A.Boothe
Isolation of a herpes - like virus from Lymphosarcomatous Cattle
Arch.f.ges.Virusforschung 37, 85 - 96 (1972)
- (35) MARTIN C.M., S.Magnuson, P.J.Goscienski, G.F.Hansen
Common human viruses as carcinogen vectors
Science 134, 1985 - 86 (1961)
- (36) MUNK K.
Med.Trib. Jahrgang 7, Nr. B46, 8 (1972)
- (37) MUNK K., G.Ludwig
Properties of Plaque Variants of herpes Virus Hominis Strains of Genital Origin
Arch.f.ges.Virusforschung 37, 308 - 315 (1972)
- (38) MUNK K.
Der derzeitige Stand der Krebsforschung
Österr. Zeitschrift f.Erforsch.u.Bekämpf.d.Krebskrankh. (Krebsarzt) 25, 286 - 297 (1970)
- (39) NAIB Z.M., A.J.Nahmias, W.E.Josey, J.H.Kramer
Genital herpetic infection, association with cervical dysplasia and carcinoma
Cancer 23, 940 - 45 (1969)
- (40) NETTLESHIP A., A.G.Smith
Studies on the early phase of induced fibrosarcoma in the hamster
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 74, 800 - 802 (1950)
- (41) NIELSEN G., D.Peters
Virale Blastogenese
Med.Welt 49, 2693 - 2699 (1968)
- (42) OTTE H.J., H.Reploh
Lehrbuch der Med. Mikrobiologie
Gustav - Fischer Verlag, 554 - 557 (1968)
- (43) POTTER A.M., C.W.Potter, J.S.Oxford
Chromosome, Transplantation and Tumor Antigen Studies of Three Virus - induced Cell Lines
Arch.f.ges.Virusforschung 33, 61 - 71 (1971)
- (44) POTTER C.W., J.M.Hoskins, J.S.Oxford
Immunological Relationship of some Oncogenic DNA - Virus
Arch.f.ges.Virusforschung 27, 73 - 86 (1969)
- (45) PREHN R.T.
Function of depressed immunologic reactivity during carcinogenesis
J.nat.Cancer Inst. 31, 791 - 805 (1963)

- (46) RAPP W.
Tumorgenese als immunologisches Problem
Med.Welt 23 Heft 21, 788 - 792 (1972)
- (47) RAWLS W.E., W.A.F. Tompkins, M.E. Figueroa, J.L. Melnick
Herpes - virus type 2 : association with carcinoma of the cervix
Science 161, 1255 - 56 (1968)
- (48) RIVIERE M.R., I. Chouroulinkov, M. Guérin
Production de tumeurs au moyen de substances chimiques cancérogènes chez le hamster. II. Etude du méthylcholanthrène, du benzopyrène et du diméthylbenzanthrène injectés à des doses diverses
Bull.Canc. 50, 275 - 289 (1963)
- (49) RIVIERE M.R., I. Chouroulinkov, M. Guérin
Production de tumeurs au moyen de substances chimiques cancérogènes chez le hamster. I. Etude d'un sarcome induit par méthylcholanthrène transplantable et métastasant
Bull.Canc. 48, 271 - 281 (1961)
- (50) ROE F.J., K.E.K. Rowson
The induction of cancer by combination of viruses and other agents
Intern.Rev.Exp.Path. 6, 182 - 227 (1968)
- (51) RÖMPP H.
Chemie Lexikon Band II
Franckh'sche Verlagsbuchhandlung Stuttgart, 4026 (1966)
- (52) ROMEIS
Mikroskopische Technik
Leibnitz Verlag 692 (1948)
- (53) ROUS P.
J.Exp.Med. 13, 397 (1911)
- (54) ROUS P., W.F. Friedewald
Common human viruses as carcinogen vectors
J.Exp.Med. 79, 511 (1944)
- (55) ROUS P., J.G. Kidd
The carcinogenic effect of a papilloma virus on the tarred skin of rabbits. I. Description of the phenomenon
J.Exp.Med. 67, 399 - 428 (1938)
- (56) ROYSTON J., L. Aurelian
Immunofluorescent detection of herpes virus antigens in exfoliated cells from human cervical carcinoma
Proc.Nat.Acad.Science (Wash.) 67, 204 - 212 (1970)
- (57) SACHS L.
Molekulare Biologie des malignen Wachstums
Springer Verlag (1966)

- (58) SCHMÄHL D.
Entstehung, Wachstum und Chemotherapie maligner Tumoren
Editio Cantor, Aulendorf (1970)
- (59) SIEGENTHALER W.
Klinische Pathophysiologie
Thieme Verlag, 113 (1970)
- (60) SCUTHAM M.C., S.Tanaka, T.Arata, D.Simkovic, M.Miura, S.F.Petrorulos
Enhancement of responses to chemical carcinogens by non-oncogenic viruses and antimetabolites
Prog.Exp.Tumor Res. 11, 194 - 212 (1969)
- (61) SPINELLI A.
Tumori 2, 367 (1941)
- (62) SPRECHER - GOLDBERGER S., L.Thiry, J.F.Cattoor, R.Hooghe, J.Pestian
Herpes virus type 2 infection and carcinoma of the cervix
Lancet, August 1, 266 (1970)
- (63) STANLEY W.M.
Krebsarzt 12, 307 (1957)
- (64) TANAKA S., M.C.Southam
Joint action of herpes simplex virus and 3-methylcholanthrene in production of papillomas in mice
J.Nat.Canc.Inst. 34, 441 - 451 (1965)
- (65) THOMAS J.A.
Inocuité du méthylcholanthrène inséré sous forme de granule dans la chambre antérieure de l'oeil chez le rat
C.R.Soc.Biol. 126, 1176 - 1178 (1937)
- (66) TOTH B.
A critical review of experiments in chemical carcinogenesis using newborn animals
Canc.Res. 28, 727 - 738 (1968)
- (67) TRENTIN J.J., G.L.v.Hoosier, D.B.Ferguson, I.Kitamura
Oncogenic evaluation in hamsters of human picorna-, paramyxovirus- and herpes-viruses
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 132, 912 - 915 (1969)
- (68) WIESMANN E.
Med. Mikrobiologie
Thieme Verlag, 298 - 308 (1971)
- (69) WIELAND H., E.Dane
Zeitschr.f.physiol.Chemie 219, 240 (1933)
- (70) ZILBER L.A., G.J.Abelev
The Virology and Immunology of Cancer
Arch.f.ges.Virusforschung 36, 287 - 288 (1968)

Herrn Prof. Goetz danke ich
für die Überlassung dieses Themas.
Fraulein Nickel für die technische Hilfe.

Diese Arbeit wurde mit Unterstützung der
Friedrich-Baur-Stiftung durchgeführt.

Lebenslauf

23. 10. 1945 geboren in Neumünster in Schleswig-Holstein
als 2. Kind des Helmut Walter und seiner
Ehefrau Anneliese Walter, geb. Meineke
- 1952 - 1956 Volksschule in Lübeck
- 1956 - 1967 Gymnasium in Lübeck, Bonn, Köln, Hamburg,
Fürstenfeldbruck
- 1967 Abitur am Gymnasium Fürstenfeldbruck
- Oktober 1967 Beginn des Medizinstudiums an der Univer-
sität München
- 1970 Physikum in München
- Während des klinischen Studiums Famulaturen
auf der Internen, Chirurgischen und Gynäko-
logischen Abteilung des Kreiskrankenhauses
Fürstenfeldbruck sowie an der Kinderklinik
der Universität München
- 1970 Heirat mit Martha Walter, geb. Biechl
- 1971 Geburt der Tochter Bettina Walter
- 1971 Beginn meiner Doktorarbeit im Viruslabor der
Universitäts-Kinderklinik in der Friedrich -
Baur - Stiftung
10. 9. 1973 -
19. 12. 1973 Examen in München

